

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
**INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
 PARIS

①1 N° de publication : **2 688 228**

(à n'utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

②1 N° d'registrement national : **92 02658**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 N 15/53, 15/67, 15/83, A 01 H 5/00

①2

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 05.03.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
 demande : 10.09.93 Bulletin 93/36.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : **INSTITUT NATIONAL DE LA  
 RECHERCHE AGRONOMIQUE — FR.**

⑦2 Inventeur(s) : Vincentz Michel, Dorhac François,  
 Chupeau Yves, Morot-Gaudry Jean-François et  
 Caboche Michel.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau.

⑤4 Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante.

⑤7 Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou  
 abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, ca-  
 ractérisé en ce qu'on induit une surexpression de la Nitrate  
 Réductase dans la plante, de manière à ce qu'on induit une  
 surexpression de l'activité Nitrase Réductase dans la  
 plante.

FR 2 688 228 - A1



La présente invention concerne un procédé d'amélioration de la précocité de plantes, notamment des plantes supérieures. La présente invention concerne également un procédé d'abaissement de la teneur en nitrates stockés dans les plantes, notamment au niveau foliaire le cas échéant.

Les espèces cultivées ont un cycle de reproduction dont la durée limite souvent l'utilisation dans les régions septentrionales. En effet, la récolte de l'espèce doit pouvoir être effectuée avant le retour de mauvaises conditions météorologiques. Dans de nombreux exemples, la maturation des organes récoltés et des graines ne peut être obtenue en temps utile et rend nécessaire la récolte avant maturité, ou compromet la récolte. Ainsi de nombreuses espèces telles que le soja ne sont cultivées qu'au dessous de certaines latitudes pour cette raison. Par ailleurs des espèces déjà cultivées en zones septentrionales, ou en altitude, gagneraient à avoir un cycle plus court pour les mêmes raisons.

On remédie classiquement à ce type de problème, soit en utilisant des conditions de culture artificielles (culture en serre), méthode exploitable pour des cultures maraîchères, soit en sélectionnant pour une précocité accrue. Un gain de précocité peut être obtenu, soit en raccourcissant la durée de la phase de croissance végétative, soit en accélérant l'induction florale, soit enfin en facilitant la maturation des fruits ou graines à récolter. En général, la durée de la phase de croissance végétative apparaît contrôlée par un ensemble complexe de gènes, et se comporte comme un caractère quantitatif. Il n'y a pas d'indication d'un lien de causalité entre cette durée et un aspect particulier du métabolisme de la plante.

Le but de la présente est de fournir un procédé permettant de raccourcir la durée de la phase végétative, et donc d'obtenir un gain de précocité.

On entend donc, dans la présente demande comme dans le domaine technique de la présente invention, par "précoces" des variétés dont la durée entre la mise en terre de la graine et la récolte ultérieure est réduite. Une "précocité accrue" implique une durée de la phase de croissance de la plante plus brève qui conduit à une floraison et une maturation des fruits ou graines à récolter avancées dans le temps par rapport à la normale.

Un autre but de la présente invention était d'abaisser la teneur en nitrate de certaines plantes, notamment au niveau foliaire. Le taux élevé de nitrates peut en effet induire des risques pour la santé ainsi que des désagréments au plan des propriétés organoleptiques de certaines plantes, en particulier pour les épinards, la laitue, ou la carotte. C'est pourquoi les teneurs en nitrate, dans les plantes comestibles, sont maintenant réglementées dans de nombreux pays.

La Nitrate Réductase est une enzyme clé connue pour entrer en jeu dans la première étape de l'assimilation du nitrate dans les plantes. Le nitrate est la plus importante source d'azote pour les plantes supérieures. Le nitrate est absorbé par les racines, transporté dans divers tissus de la plante, puis réduit en ammoniacque en deux étapes. La première étape exige l'enzyme Nitrate Réductase (NR) qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite dans le cytoplasme. Dans une seconde étape, le nitrite est ensuite réduit dans le chloroplaste par la Nitrite Réductase. La réduction du nitrate est considérée comme une étape de contrôle majeure dans l'assimilation du nitrate et elle a été étudiée en détail chez les plantes supérieures (Wray, 1986). La NR est un homodimère portant trois cofacteurs, à savoir FAD, cytochrome  $b_{557}$  et un cofacteur molybdoptérine (Campbell, 1988).

L'introduction dans une plante du gène de la NR a été proposée pour modifier les caractéristiques d'assimilation des nitrates par les plantes de manière prospective ou spéculative mais sans qu'aucune application concrète n'ait pu être effectivement trouvée jusqu'à ce jour.

Dans tous les cas, l'utilisation était toujours limitée à la modulation de l'assimilation des nitrates dans le temps, c'est-à-dire suivant le stade de développement de la plante, ou dans l'espace, c'est-à-dire pour favoriser l'assimilation au niveau des racines, des tubercules ou foliaire.

On a découvert de façon inattendue que la surexpression de la Nitrate Réductase dans les plantes transgéniques dans lesquelles un gène de NR a été introduit permettait d'une part d'abaisser de manière significative les teneurs en nitrate stockées sous forme de réserve dans la plante et, d'autre part se traduisait par une précocité plus grande, avec un gain de précocité de germination, une croissance accrue et une floraison plus précoce, c'est-à-dire un développement végétatif de la plante plus rapide qui la fait aboutir à floraison avec une avance d'environ deux semaines par rapport aux plantes témoins.

Une incidence de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la précocité est inattendue. Il n'y a pas de travaux qui portent sur de telles études dans la littérature. Chez les céréales, une incidence éventuelle de la quantité de Nitrate Réductase sur les rendements a été étudiée par de nombreux auteurs (Clark, 1990). Toutefois, à l'occasion de ces études, il n'a pas été noté de relation évidente entre l'expression de l'enzyme et la précocité.

Les travaux récents de génétique n'ont pas non plus permis d'établir de relations directes entre la quantité de Nitrate Réductase exprimée au niveau foliaire et le transport ou le stockage du nitrate dans diverses espèces. L'étude de mutants déficients pour l'enzyme Nitrate Réductase de *Nicotiana plumbaginifolia* (Saux et coll, 1987) ou d'orge (Warner et Huffaker, 1989) a établi que ces mutants accumulent du nitrate au niveau foliaire à un niveau comparable aux plantes témoins capables d'assimiler le nitrate. La Nitrate Réductase n'est donc pas nécessaire au transport du nitrate. Par ailleurs, divers travaux d'étude du contrôle génétique de la teneur en nitrate, réalisés par Ostrem et Collins (1983) chez le tabac, et par Blim-Zandstra et Eenink (1986) chez la laitue ont abouti à la conclusion qu'il n'y avait pas non plus de corrélation nette entre la teneur en nitrate foliaire et la quantité de Nitrate Réductase foliaire. Cette absence de corrélation a été expliquée par le fait que la Nitrate Réductase étant elle-même inductible par le nitrate (Crawford, 1989), l'accumulation ou la réduction de la teneur en nitrate peuvent s'accompagner d'une augmentation ou d'une réduction corrélative de la quantité de cette enzyme dans les tissus, par effet rétroactif. Par contre, divers auteurs ont émis l'hypothèse que ce serait le besoin de la plante en osmoticum qui pourrait gouverner ses caractéristiques de stockage du nitrate, et non pas l'utilisation du nitrate par la Nitrate Réductase. La réduction de la teneur en nitrate et la précocité accrue des plantes qui surexpriment la Nitrate Réductase apparaissent donc inattendues.

Dans un cas comme dans l'autre, le mécanisme et les justifications théoriques manquent pour expliquer ces propriétés.

La présente invention a donc pour objet un procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de l'enzyme Nitrate Réductase dans la plante. En d'autres termes, on induit une surexpression de l'activité Nitrate Réductase dans la plante.

On entend ici par "Nitrate Réductase" (NR) une définition fonctionnelle qui inclut toute Nitrate Réductase capable de fonctionner comme un marqueur de sélection en conférant l'activité Nitrate Réductase à une cellule hôte déficiente en Nitrate Réductase. Cette définition inclut aussi toute Nitrate Réductase capable de fonctionner dans une plante donnée pour accroître l'activité Nitrate Réductase de ladite plante. Ce terme inclut donc non seulement l'enzyme spécifique de la plante spécifique à traiter mais toute autre enzyme Nitrate Réductase d'autres plantes, de microbes ou même d'autres espèces eucaryotes, si cette Nitrate Réductase est capable de fonctionner dans les plantes à traiter.

On entend par "surexpression" aussi bien une augmentation du taux d'activité de NR par rapport au taux exprimé dans une plante normale, qu'une dérégulation de l'expression conduisant à l'expression de l'activité NR dans un tissu ou à un stade de développement où celle-ci n'est normalement pas exprimée.

L'obtention de plantes exprimant de façon dérégulée la Nitrate Réductase peut être obtenue par différentes approches :

- 1) En sélectionnant des mutants de la plante à améliorer, mutants surexprimant la Nitrate Réductase ;
- 2) En introduisant par les méthodes du génie génétique un gène de Nitrate Réductase éventuellement modifié de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante à améliorer ;

3) En introduisant simultanément par les méthodes du génie génétique un gène de Nitrate Réductase et un gène de Nitrite Réductase éventuellement modifiés de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression dérégulée simultanée de ces deux enzymes dans la plante à améliorer.

4) En introduisant par les méthodes du génie génétique un gène de régulation de l'expression de la Nitrate Réductase et de la Nitrite Réductase éventuellement modifiés, de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression dérégulée conjointe de la Nitrate Réductase et de la Nitrite Réductase dans la plante à améliorer.

Ces plantes pourront être modifiées par les méthodes du génie génétique décrites dans la littérature, par transformation de cellules suivie de leur régénération, ou par transformation de tissus ou de gamètes.

Dans un mode préféré de réalisation du procédé de l'invention, caractérisé en ce qu'on introduit dans le génome de la plante un gène étranger codant pour la Nitrate Réductase dans des conditions permettant son expression.

On entend par "gène fonctionnel codant pour la NR" une séquence d'ADN codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus comme "Nitrate Réductase", ladite séquence peut donc être plus courte ou plus longue que la séquence codante totale du gène complet de l'enzyme. En particulier, le "gène fonctionnel" pourra correspondre à une séquence codante partielle à savoir dépourvue des introns.

Le gène étranger est en général un gène hétérologue, c'est-à-dire qui provient d'un organisme d'une espèce différente que la cellule hôte, le gène codant pour un polypeptide ordinairement non produit par la plante dans le génome de laquelle il est introduit.

Le gène étranger introduit dans le génome de la plante peut aussi être un gène homologue au gène endogène c'est-à-dire dont l'expression produit la Nitrate Réductase ordinairement produite par la plante.

Par "conditions permettant son expression", on entend que le gène codant la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle d'éléments assurant son expression.

En particulier, la séquence d'ADN codant pour la Nitrate Réductase est associée à une séquence régulatrice appropriée pour sa transcription et sa traduction (ci-après régulon) tels que des promoteurs, y compris des codons start et stop, des "enhancer", des opérateurs. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces promoteurs sont bien connus de l'homme du métier.

Selon un autre mode de réalisation, on peut se contenter d'agir sur la régulation du gène endogène de la Nitrate Réductase en modifiant les gènes de régulation qui contribuent à son expression de manière à ce qu'ils induisent une surexpression de Nitrate Réductase endogène du fait de ces modifications, en particulier, on place le gène de la Nitrate Réductase sous le contrôle d'un promoteur hétérologue fort fonctionnel dans la plante transformée.

Par ailleurs, on a découvert selon la présente invention que le promoteur endogène des gènes de Nitrates Réductases de plante nécessite la présence de sucre pour être activé et induire l'expression de la Nitrate Réductase, la teneur en sucre dans la plante constitue dès lors un facteur limitant, en particulier aux faibles intensités lumineuses.

C'est pourquoi, avantageusement, lorsqu'on place le gène de la Nitrate Réductase endogène ou étranger sous le contrôle d'un promoteur hétérologue, de préférence, le promoteur hétérologue utilisé ne sera pas dépendant de la teneur en sucres.

Ainsi, le promoteur 35S du CaMV (Kay, Chan, Daly et McPherson, 1987), ou le promoteur du gène codant pour le facteur d'élongation de la traduction (Curie et coll. 1991), ou tout autre promoteur dont le fonctionnement ne dépend pas de la présence de sucre sont-ils utilisés avantageusement à cet effet. De même, de façon appropriée, des promoteurs inductibles par une carence en assimilats carbonés dérivés de la photosynthèse pourront être employés.

C'est pourquoi également, selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, on se contente d'augmenter la teneur en sucre dans la plante pour favoriser l'expression de la Nitrate Réductase endogène sans introduire de gène étranger.

5 Comme gène hétérologue codant pour une Nitrate Réductase, on peut citer en particulier des gènes de plantes, notamment dicotylédones, comme le tabac (Vaucheret et coll. 1989), la tomate (Daniel-Vedele et coll. 1989), Arabidopsis (Crawford et coll. 1988), le haricot (Hoff, Stummann, et Henningssen, 1991) ou monocotylédones comme l'orge (Kleinhofs et coll. 10 1988) et le riz (Choi, Kleinhofs et An, 1989).

Il doit donc être bien entendu que l'invention implique non seulement l'utilisation des ADNc codant la Nitrate Réductase provenant notamment de plantes, mais aussi toute séquence d'ADN équivalente, c'est-à-dire qui diffère de la séquence d'ADNc seulement par une ou 15 plusieurs mutations neutres, c'est-à-dire dont le changement ou la substitution de nucléotides en cause n'affecte pas la séquence primaire de la protéine résultante.

La présente invention implique aussi l'utilisation de séquences d'ADN complémentaires aux séquences mentionnées ci-dessus, en particulier 20 qui présentent une homologie suffisante avec une séquence d'ADNc complémentaire de l'ARNm d'une Nitrate Réductase, de telle sorte qu'elles s'hybrident avec ladite séquence d'ADNc à 80% dans des conditions stringentes.

En fait, les Nitrates Réductases des différentes espèces 25 dicotylédones présentent une grande homologie. Ainsi, la Nitrate Réductase de tomate présente environ 90% d'homologie avec la Nitrate Réductase de tabac et la séquence d'ADN codant la Nitrate Réductase de tomate présente une homologie de plus 80% (environ 81%) avec la séquence d'ADN codant la Nitrate Réductase de tabac.

30 Les Nitrates Réductases sont caractérisées en particulier par la présence des acides aminés invariants suivants (Daniel-Vedele, Dorbe, Caboche, et Rouzé, 1989) dans la séquence codante de l'enzyme (positions fournies par rapport à la séquence en acides aminés de la Nitrate Réductase de tabac) :

35



- Séquence CAGNRRKE des acides aminés 180 à 187 du domaine de fixation du cofacteur à molybdène de l'enzyme,
- Séquence HPGG des acides aminés 564 à 567 du domaine cytochrome b<sub>5</sub> de l'enzyme,
- 5 - Séquence GLP des acides aminés 677 à 679 du domaine cytochrome b<sub>5</sub> réductase de l'enzyme.

Les demandes de brevet EP 283 338 et EP 409730 décrivent des séquences d'ADN codant pour la Nitrate Réductase de tabac et de tomate respectivement.

10 Ledit gène fonctionnel codant pour la Nitrate Réductase peut être introduit dans des cellules de plantes selon des techniques connues. On pourra utiliser avantageusement dans ce cas, mais non obligatoirement le régulon constitutif du gène de la Nitrate Réductase.

On peut citer, tout d'abord, les méthodes de transfert direct  
15 de gènes telles que la micro-injection directe dans des cellules d'embryon de la plante (Neuhaus et Coll., 1987) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1988) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules (Mc Cabe et Coll., 1988)..

20 On peut aussi infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'Agrobacterium tumefaciens selon une méthode éprouvée (Schell et Van Montagu, 1983) ou d'Agrobacterium rhizogenes notamment pour les espèces récalcitrantes à la transformation (Chilton et Coll., 1982). La souche bactérienne comportera le gène codant pour la Nitrate  
25 Réductase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. La souche pourra être transformée par un vecteur dans lequel est inséré le gène codant la Nitrate Réductase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. Ce gène sera inséré par exemple dans un vecteur binaire tel que pBIN19 (Bevan, 1984) ou pMON 505 (Horsch et Klee, 1986)  
30 ou tout autre vecteur binaire dérivé des plasmides T1 et Ri. Il pourra aussi être utilement introduit par recombinaison homologue dans un plasmide T1 ou Ri désarmé, tel que pGV 3850 (Zambryski et coll., 1983) avant la transformation de la plante.

A titre de vecteur d'expression comprenant le gène fonctionnel de la Nitrate Réductase selon l'invention, on peut citer les vecteurs  
35

comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de répllication telle que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus, etc. On utilisera de préférence toutefois des plasmides.

Lorsque l'on introduit un gène fonctionnel codant pour une  
5 Nitrate Réductase dans le génome de la plante, ce sera de préférence sous le contrôle de promoteur hétérologue.

A titre illustratif, on peut citer à cet effet des promoteurs constitutifs, comme celui du facteur d'élongation de la traduction (Curie et coll. 1991), des promoteurs tissus spécifiques comme celui de la patatine  
10 exprimé dans les tubercules (Rocha-Sosa et coll., 1989), ou comme celui de la petite sous-unité de la ribulose-bis-phosphate décarboxylase exprimés dans les feuilles (Thomson et White, 1991), ou dérivés de virus végétaux comme le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ou CaMV (Kay, Chan, Daly et McPherson, 1987) ou dérivés de l'ADN-T des  
15 Agrobactéries ou toute source de promoteur fonctionnel dans la plante transformée.

Dans les exemples ci-après, donnés à titre purement illustratif, le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est dérivé du gène Nia 2 de la Nitrate Réductase du tabac décrit dans la Figure 3 (  
20 Vaucheret et coll., 1989) et le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans le plasmide pBin 19.

Enfin, la présente invention a également pour objet des plantes obtenues par le procédé selon l'invention.

Les caractéristiques des plantes exprimant de manière  
25 dérégulée la Nitrate Réductase conjointement ou non avec l'expression dérégulée de la Nitrite Réductase selon l'invention sont un gain de précocité de germination, une croissance accrue et une floraison plus précoce.

En outre, cette expression dérégulée se traduit par des  
30 caractéristiques supplémentaires telles que :

- une baisse de la teneur en nitrate dans les tissus de la plante, et
- de conférer aux plantes obtenues une caractéristique qui permet de les distinguer aisément des plantes non modifiées du fait de la sensibilité accrue au chlorate des plantes modifiées.

35

Le chlorate est utilisé comme défoliant. Un traitement au chlorate s'avère utile en préalable à la récolte de certaines plantes à maturité comme le coton.

5 Ainsi, on peut, grâce au procédé de l'invention, utiliser le chlorate à des doses moins importantes pour induire la défoliation des plantes modifiées selon l'invention si ce traitement s'avère utile.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée du mode de réalisation suivant.

10 La Figure 1 représente l'étude comparée de la croissance de la descendance du tabac transformé 3051 PBD6, cultivée in vitro. Le nombre moyen de feuilles par plantule (Ordonnée) a été mesuré et représenté en fonction du nombre de jours écoulés après le semis (Abscisse).

15 La Figure 2 représente la croissance en serre et floraison de plantes surexprimant ou non la Nitrate Réductase. Ces plantes ont été repiquées en serre au même stade de développement et cultivées dans les mêmes conditions expérimentales.

La Figure 3 représente la séquence du gène dérivé de Nia2 de la Nitrate Réductase de tabac privé de ses introns.

20

### EXEMPLE 1

#### Effet de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la précocité du tabac

25 Des gènes recombinants dérivés du gène de la Nitrate Réductase de tabac (Brevet Européen EP 283 338) ont été initialement réalisés selon une procédure classique décrite par Vincentz et Caboche (1991) afin de compléter des mutants de *N. plumbaginifolia* déficients pour la Nitrate Réductase. Ces gènes sont constitués de la manière  
30 suivante. La séquence codante de la Nitrate Réductase (ADNc dérivé du messenger d'origine Nia2) précédée ou non de la séquence 5' non traduite de ce transcrit, et suivie de séquences d'arrêt de la transcription dérivée d'un des gènes de la Nitrate Réductase du tabac, ou du CaMV a été placée sous le contrôle du promoteur fort de l'ARN 35S du CaMV.

35

Dans le présent exemple, ce gène a été inséré dans un plasmide vecteur binaire pBin19 (BEVAN, 1984) et introduit selon une procédure classique dans le génome de tabacs industriels, variétés PBD6 et BB16, par l'intermédiaire d'Agrobacterium tumefaciens (souche LBA 4404) (Hoekema et al., 1983). La transformation a été réalisée par inoculation de 5  
disques foliaires d'une surface moyenne de 5 cm<sup>2</sup>. Le plasmide pBin19 portant le gène NPTII (néomycine phosphotransférase) conférant la résistance à la kanamycine après transformation, les transformants ont été sélectionnés pour leur aptitude à se développer sur une dose de 100 mg/l de cet antibiotique. Sur un total de 125 explants inoculés pour la variété BB16, 10  
et 190 explants pour la variété PB D6, le nombre de plantes transformées obtenues s'élève respectivement à 10 et 281. Parmi ces plantes, certaines peuvent atteindre un niveau d'activité Nitrate Réductase six fois supérieur à celui observé pour le type sauvage. Les caractéristiques de germination et 15  
de croissance de deux transformants qui surexpriment la Nitrate Réductase ont été présentées ici et sont représentatives.

#### Etude de la croissance in vitro de la descendance du transformant 30.51

Ce transformant obtenu à partir du génotype PBD6, surexprime approximativement 600% du niveau de la Nitrate Réductase du témoin non transformé. Sa descendance a été récoltée et étudiée. Après 20  
stérilisation en surface pendant 40 minutes dans une solution de 800 ml d'eau contenant un comprimé de Bayrochlore de 1 ml de Teepol, puis un rinçage par trois fois dans 800 ml d'eau stérile, les graines ont été semées sur du milieu de bouturage contenant 20 mM de nitrate. 12 graines de cette 25  
plante, ainsi qu'un nombre identique du type sauvage ont ainsi été cultivés in vitro dans des tubes, puis placés dans des chambres de culture dont la température est maintenue à 25°C et le degré hygrométrique à 65% ; l'éclairage de ces chambres est assuré par des tubes fluorescents type "blanc industrie" Philips 40W, assurant une intensité lumineuse de 60μE 30  
m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16 heures par jour. La Figure 1 montre que la descendance du transformant germe significativement plus précocement que celle du témoin non transformé. Une moyenne effectuée sur chaque lot révèle que la descendance de la plante transformée germe 9 jours avant celle du type sauvage.

35

Etude de la croissance de la descendance du transformant primaire 30.1 BB16

Les graines issues de la plante 30.1 BB16 (transformant primaire surexprimant le gène de la Nitrate Réductase à un niveau trois fois supérieur au témoin non transformé) ont été semées sur de la tourbe et alimentées par la solution nutritive de Coïc et Lesaint, contenant 20 mM de nitrate comme source azotée. 10 plantes ont ainsi été disposées en serre sous un éclairage de 16 heures par jour. Il ressort de leur étude (Figure 2) que les plantes surexprimant constitutivement le gène de la Nitrate Réductase, (telles que la plante 30.1.10 prise comme exemple) voient leur floraison accélérée de 10 jours par rapport aux plantes du type sauvage (WT.2 et 30.1.9, cette dernière plante étant une plante du type sauvage ne surexprimant pas la Nitrate Réductase et ne résistant pas à la kanamycine, ayant ségrégué dans la descendance du transformant primaire).

EXEMPLE 2

Etude de la sensibilité au chlorate des plantes transgéniques exprimant constitutivement le gène de la nitrate réductase

Des semis en terrine de descendants homozygotes du transformant 30.51PBD6 ont été effectués parallèlement à des semis témoins. Ces terrines ont été arrosées avec une solution contenant 0,5 mM, 1,5 mM, 5 mM ou 10 mM de chlorate de potassium dix jours après le semis, au stade deux feuilles. Alors que les plantes témoins manifestent les symptômes de chlorose puis de brûlure foliaire caractéristiques de l'effet du chlorate uniquement aux doses de 5 et 10 mM, les plantes transgéniques sont tuées dès la dose la plus faible de chlorate employée (0,5 mM).

EXEMPLE 3

Effet de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la teneur foliaire en nitrate chez *Nicotiana plumbaginifolia*

La séquence codante de la Nitrate Réductase (ADNc dérivé du messenger d'origine Nia2) précédée de la séquence 5' non traduite de ce transcrit, et suivie de séquences d'arrêt de la transcription dérivées du gène Nia2 de la Nitrate Réductase du tabac a été placée sous le contrôle du

promoteur fort de l'ARN 35S du CaMV. Dans le présent exemple, ce gène a été inséré dans un plasmide vecteur binaire pBin19, et introduit dans le génome du mutant E23 de *Nicotiana plumbaginifolia* déficient pour le gène de structure de la Nitrate Réductase selon une procédure classique décrite dans l'exemple 1. Un transformant, C1, exprimant une activité Nitrate Réductase de 29 nM de nitrite par minute et par mg de protéines totales, soit 178% du témoin sauvage a été étudié. Des plants de *Nicotiana plumbaginifolia* sauvages ou du transformant C1 ont été cultivés en serre, à l'I.N.R.A. de Versailles au cours de l'automne 1990.

a) Au cours du premier essai (7/09 au 7/11/90), les plantes ont été placées sur un mélange tourbe/argile et arrosées 2 fois par 24 h par une solution nutritive complète nitroco-ammoniacale (430 ml par plante et par jour), contenant soit 10,2 mM de nitrate et 1,8 mM d'ammonium soit 15,3 mM de nitrate et 2,7 mM d'ammonium. L'éclairement naturel a été complémenté par un éclairage d'appoint assurant de l'ordre de  $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR pendant 16 h (lampes phytoclaude). La récolte a eu lieu au stade début floraison. Des analyses ont été pratiquées sur 4 plantes prises au hasard parmi les 28 plantes cultivées, par génotype et par type de condition de culture.

b) Au cours du second essai (25/10/90 au 30/01/91), les plantes ont été placées sur sable inerte et arrosées toutes les 15 minutes pendant 24 h, par une solution nutritive complète (9,6 l par plante et par jour) contenant soit 1 mM de nitrate seul, soit 12 mM de nitrate seul. L'éclairement naturel a été complémenté par un éclairage d'appoint identique à celui de l'essai précédent mais pendant 12 h. Les plantes ont été récoltées au stade rosette, les analyses ont été pratiquées sur un échantillon moyen regroupant 4 plantes prises au hasard parmi les 14 plantes cultivées, par génotype et par type de condition de culture.

Les analyses pratiques après récolte montrent les tendances suivantes (voir tableau ci-joint) :

1) La teneur en nitrate est beaucoup plus faible chez les plantes transformées que chez les plantes témoins (de -30% à -70%) ;

2) La teneur en azote réduit est plus élevée chez les plantes transformées. Il est à noter qu'il existe un seuil maximal correspondant à 4,5% d'azote réduit chez tous les types de plantes quel que soit le type de nutrition azotée ;

5 3) La teneur en azote protéique est la même chez les plantes transformées et témoins ;

4) La teneur en azote total chez les plantes transformées est légèrement plus faible que chez les plantes témoins ;

10 5) Le type de nutrition azotée (en quantité et en qualité) modifie la teneur en composés azotés par plante mais ne semble pas avoir d'effet sur le comportement général des plantes.

En conclusion, les plantes transformées accumulent beaucoup moins d'azote sous forme nitrique que les plantes témoins. Les plantes transformées accumulent l'azote sous forme réduite. Cet excès d'azote  
15 réduit interne pourrait être l'une des causes de la plus forte teneur en matière sèche (M.S.) ainsi que de la moindre production de biomasse fraîche et sèche (de -15% à -30%) observées chez les plantes transformées.

20

25

30

35

TABLE 1 : Teneur foliaire en azote total, nitrique, réduit ou protéique de plantes surexprimant de façon dérégulée la Nitrate Réductase.

	N total %M.S.	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> %M.S.	N réduit* %M.S.	N protéique %M.S.	% M.S.	M.S. g/plante
<b>Essai 1</b>						
solution nutritive :						
10,2 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 1,8 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>						
TEMOIN	4,09	1,11	2,98	2,07	10,7	19,5
TRANSFORME	4,03	0,67	3,36	2,12	10,4	16,4
solution nutritive :						
15,3 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2,7 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>						
TEMOIN	4,56	1,78	2,78	2,21	8,2	18,2
TRANSFORME	3,80	0,53	3,27	2,17	11,6	19,7
<b>Essai 2</b>						
solution nutritive :						
1 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>						
TEMOIN	5,51	1,09	4,42	2,82	5,9	3,3
TRANSFORME	5,05	0,62	4,43	2,92	6,5	2,5
solution nutritive :						
12 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>						
TEMOIN	6,06	2,14	3,92	2,89	6,0	3,95
TRANSFORME	5,90	1,49	4,41	2,84	6,7	2,85

\* calcul N réduit : N total - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



#### EXEMPLE 4

##### Rôle du sucre dans l'expression de la Nitrate Réductase

Des plantes de *Nicotiana plumbaginifolia* sauvages et C1  
5 identiques à celles décrites dans l'exemple 3 ont été repiquées au stade 4  
feuilles, cultivées trois semaines en serre, à l'I.N.R.A. de Versailles au cours  
de l'automne 1990 dans un terreau arrosé par une solution nutritive  
complète nitroco-ammoniacale, contenant 12 mM de nitrate et 2 mM  
d'ammonium. Les plantes ont été transférées dans une chambre de culture  
10 pendant 6 jours et soumises à une photopériode de 16 heures à 25°C, avec  
un éclairage de  $130 \text{ mE m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR pendant 16 h (lampes phytoclaude)  
suivi de 8 heures d'obscurité à 16°C. Les plantes ont ensuite été placées à  
l'obscurité durant 72 heures, tout en restant alimentées par la solution  
nutritive. A ce stade, des analyses ont été pratiquées sur les feuilles de 4  
15 plantes prises au hasard par génotype témoin ou C1. Le niveau de transcrit  
Nitrate Réductase a été mesuré par la méthode de northern (Thomas, 1980)  
dans ces feuilles. Cette quantité de transcrit décroît d'un facteur 20 à 50  
dans les plantes témoins placées à l'obscurité, alors qu'elle décroît  
seulement de 50% dans les plantes C1, placées dans les mêmes conditions.  
20 Les feuilles prélevées sur ces plantes témoin, maintenues à l'obscurité et  
dont le pétiole est plongé durant quatre heures dans une solution de  
conservation (Chlorure de potassium 40 mM, et chlorure de calcium 10 mM)  
contenant 0,2% de glucose accumulent à nouveau du transcrit Nitrate  
Réductase à un niveau approximatif de 25% par rapport aux conditions  
25 initiales précédant le transfert à l'obscurité. Par contre, cette accumulation  
n'est pas observée pour des feuilles témoins maintenues à l'obscurité dont  
le pétiole est plongé dans la solution de conservation sans glucose. Dans les  
plantes C1, le niveau de transcrit Nitrate Réductase reste élevé aux  
diverses étapes de l'expérience, montrant que la réduction du niveau de  
30 transcrit Nitrate Réductase dans les plantes témoins ne résulte pas d'un  
ralentissement général du métabolisme dû à la carence en sucre. La teneur  
en sucre apparaît donc comme un signal important pour l'expression du  
gène non modifié de la Nitrate Réductase, et peut donc constituer un  
facteur limitant de cette expression aux faibles intensités lumineuses.

35

17

La Figure 3 représente une séquence identifiée comme ci-dessous :

Type de séquence : Nucléotide et sa protéine correspondante

5 Longueur de la séquence : 3457 paires de bases

Nombre de brins : simple

Configuration : linéaire

Type de molécule : ADN complémentaire (ADNc)

ORIGINE

10 Organisme : Plante, *Nicotiana tabacum*

Source expérimentale : feuilles

Nom de la lignée : *N. tabacum* cv. Xanthi XHFD8

CARACTERISTIQUES

de 1 à 143 paires de bases : séquence 5' non traduite (leader)

15 de 144 à 2855 paires de bases : séquence codante pour l'apoenzyme nitrate réductase

de 2856 à 3457 paires de bases : séquence 3' non traduite

PROPRIETES

ADNc du messenger codant pour l'apoenzyme de la nitrate réductase

20

25

30

35

### Bibliographie

- BEVAN M. - 1984 - Binary Agrobacterium vectors for plant transformation  
Nucleic Acid Res. 12 : 8711-8712.
- 5
- BLOM-ZANDSTRA, M. AND EENINK, A.H. - 1986 - Nitrate concentration  
and reduction in different genotypes of lettuce J. Amer. Soc. Hort. Sci 111 :  
908-911.
- 10 CAMPBELL 1988 - Higher plant Nitrate Reductase Curr. Top. Plant  
Biochem. Physiol. 7,1-15.
- CHOI, H., KLEINHOF S. A., AND AN, G. (1989) Nucleotide sequence of rice  
nitrate reductase genes. Plant Molec. Biol. 13 : 731-733.
- 15
- CHUPEAU M.C., BELLINI C., GUERCHE P., MAISONNEUVE B., VASTRA G.,  
CHUPEAU Y. (1989) Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained  
through electroporation of protoplasts. Bio/technology 7 : 503-508.
- 20 CLARK R.B. Physiology of cereals for mineral nutrient uptake, use, and  
efficiency, in "Crops as enhancer of nutrient use" Baligar V.C. and Duncan  
R.R. Eds Academic press, San Diego, London (1990) pp 131-210.
- CRAWFORD N. AND DAVIS R.W. Molecular analysis of nitrate regulation  
of nitrate reductase in squash and Arabidopsis, in "Molecular and genetic  
aspects of nitrate assimilation" Wray J. and Kinghorn J.R. Eds Oxford  
Science Publications, Oxford, New York, Tokyo (1989) pp 328-337.
- 25
- CRAWFORD, N., SMITH, M., BELLISSIMO, AND DAVIS, R.W. (1988)  
Sequence and nitrate regulation of the Arabidopsis thaliana mRNA  
encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional  
domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5006-5010.
- 30

- CURIE C., LIBOZ T., BARDET C., GANDER E., MEDALE C., AXELOS M.,  
LESCURE B. (1991) Cis and trans-acting elements involved in the activation  
of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factor  
EF-1a Nucleic Acid Res. 19 : 1305-1310.
- 5 DANIEL-VEDELE, F. DORBE, M.F., CABOCHE, M., AND ROUZE, P. (1989)  
Cloning and analysis of the nitrate reductase gene from tomato : a  
comparison of nitrate reductase protein sequences in higher plants. Gene 85  
: 371-380.
- 10 HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOOYKAAS P.J.J. et SCHILPEROORT R.A.-  
1983 - A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-  
region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature, 303, 179-180.
- 15 HOFF, T., STUMMANN, B.M., AND HENNINGSEN, K.W. (1991) Cloning and  
expression of a gene encoding a root specific nitrate reductase in bean  
(*Phaseolus vulgaris*). Physiol. Plant; 82 : 197-204.
- 20 HORSH R.B. AND KLEE H.J. (1986) Rapid assay of foreign gene expression  
in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens* Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 83 : 4428-4432.
- 25 KAY R., CHAN A., DALY M., McPHERSON J. (1987) Duplication of CaMV  
35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes Science  
236 : 1299-1302.
- 30 KLEINHOF, A., WARNER R. L., HAMAT, H.B., JURIDEK, M., HUANG, C.,  
AND SCHNORR, K. (1988) Molecular genetics of barley and rice nitrate  
reductases. Curr. Topics Plant Biochem. Physiol. 7 : 35-42.
- 35 McCABE D.E., SWAIN W., MARTINELLI B., CHRISTOU P. (1988) Stable  
transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/tech-  
nology 6 : 923-927.

- NEUHAUS G., SPANGENBERG G., MITTELSTEN SCHIED O., SCHWEIGER H.G. (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of NDNA into microspore-derived embrioids. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 30-36.
- 5 OSTREM J.A. AND COLLINS G.B. (1983) Genetic variation for nitrate concentration in *Nicotiana tabacum* L.J. *Heredity* 74 : 431-434.
- ROCHA-SOSA M., SONNEWALD U., FROMMER W. STRATMAN M., SCHELL J., WILLMITYZER L. (1989) Both develomental and metabolic signals  
10 activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 8 : 23-29.
- SAUX C., LEMOINE Y., MARION-POLL A., VALADIER M.H., DENG M., MOROT-GAUDRY J.F. (1987) Consequences of absence of nitrate reductase activity on photosynthesis in *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Plant.*  
15 *Physiol.* 84 : 67-72.
- STOCHER R.J., SCHILLITO R., SAUL M., PASKOWSKI J., POTRYKUS I. (1986) Co-transformation of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer. *Bio/technology* 4 : 1093-1096.  
20
- THOMAS S.P. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 : 442-447.
- 25 THOMSON W.F. AND WHITE M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 : 423-466.
- 30 VAUCHERET, H., VINCENTZ, M., KRONENBERGER, J., CABOCHE, M., AND ROUZE, P. (1989) Molecular cloning and characterization of the two homeologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 216 : 10-15.

VINCENTZ M. et CABOCHE M. - 1991 - Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. EMBO J., 10, 1027-1035.

- 5 WARNER R.L. AND HUFFAKER R.C. (1989) Nitrate transport is independent of NADH and NADPH nitrate reductases in barley seedlings. Plant Physiol. 91 : 947-953.

- WRAY - 1986 - The molecular genetics of higher plant nitrate assimilation  
10 - In, A genetic approach to Plant Biochemistry, A.D. Blonstein and P.J. King, eds (Springer, N.Y.), pp. 101-157.

- ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M.,  
SCHELL J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant  
15 cells without alteration of their normal regeneration capacity EMBO J 2 :  
2143-2150.

20

25

30

35

## REVENDECATIONS

1. Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on introduit dans le génome de la plante un gène étranger codant pour la Nitrate Réductase dans des conditions permettant son expression.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le gène codant pour la Nitrate Réductase provient d'un ADNc de plantes dicotylédones codant pour la Nitrate Réductase.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce qu'on infecte des explants par une souche d'Agrobactérium tumefaciens ou Agrobactérium Rhizogenèse transformée par un plasmide dans lequel est inséré ledit gène étranger codant pour la Nitrate Réductase placé sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène.

5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans un plasmide dérivé du plasmide de Ti ou Ri.

6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle d'un promoteur hétérologue fonctionnel dans la plante transformée.

7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est dérivé du gène Nia 2 de la Nitrate Réductase du tabac.

8. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du Ca MV.

9. Procédé selon l'une des revendications 2 à 8 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans le plasmide pBin 19.

10. Plante obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Plante à précocité accrue selon la revendication 10.

12. Plante à teneur en nitrates stockés réduite obtenue selon  
5 la revendication 10.

13. Plante selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente une sensibilité accrue au chlorate.

10

15

20

25

30

35



115

FIG.1

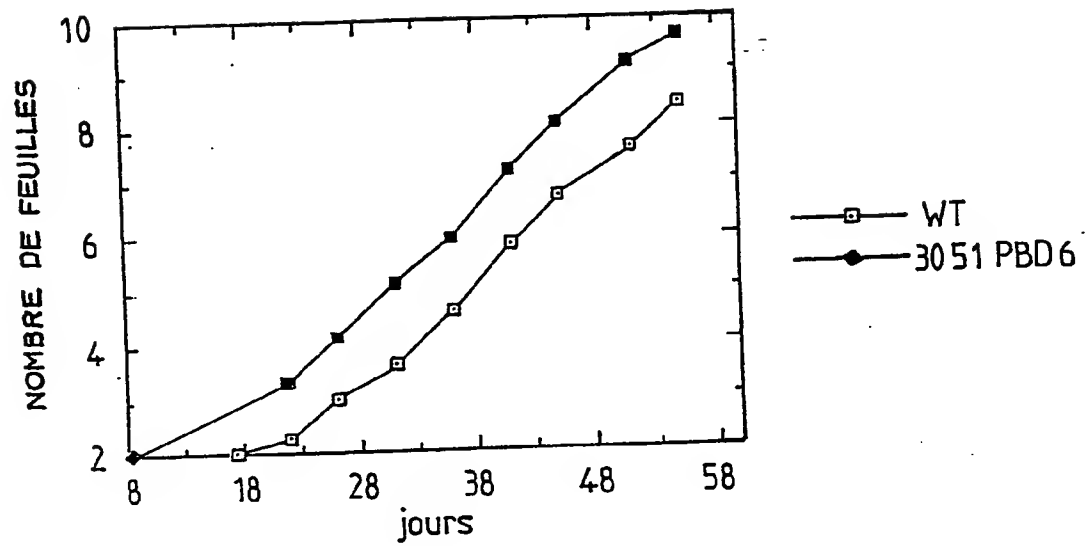
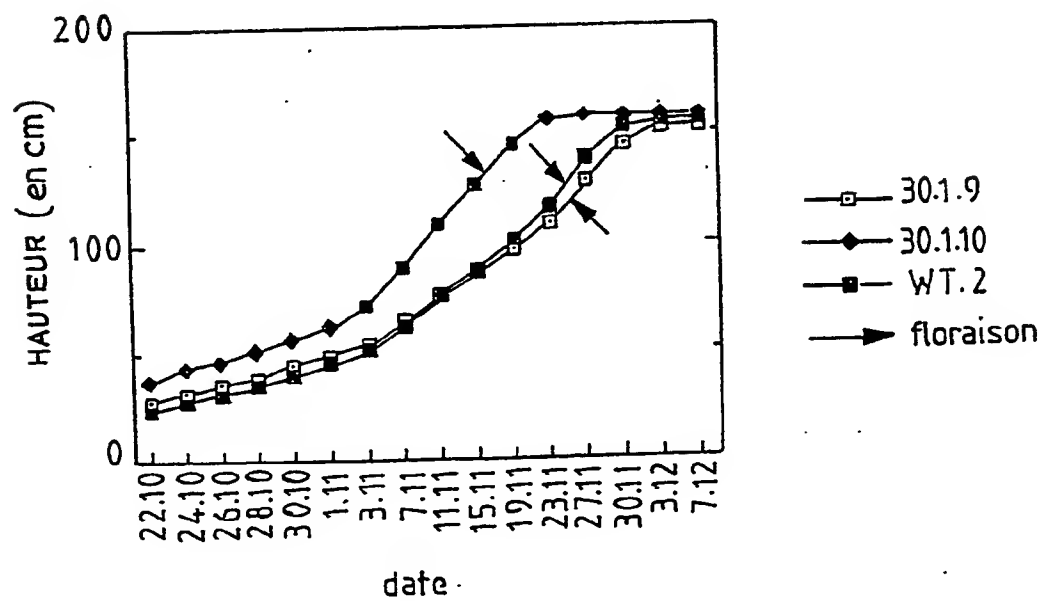


FIG.2



215

GAGCTCGTT CCCAACAGA ACAAGAAAAT CAAATCTCGG AGAGAGAGAG AGAGAAATAT	59
TTTGAGAGAG AAATACAGAA AATCTCTCTT CCTTCTTTCC TTTTTTTTC AATCCCCATT	119
CATATTCTTT TTTTAGAATA ATCT ATG GCG GCA TCT GTC GAA AAC AGG CAG	170
Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln	9
TTC AGT CAC CTA GAA GCC GGT TTA TCC CGG TCT TTC AAG CCC CGG	215
Phe Ser His Leu Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ser Phe Lys Pro Arg	24
TCT GAT TCC CCG GTT CGT GGC TGC AAC TTC CCT TCG CCC AAC AGT	260
Ser Asp Ser Pro Val Arg Gly Cys Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser	39
ACT AAT TTC CAA AAG AAA CCA AAT TCC ACC ATT TAC CTT GAT TAC	305
Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr	54
TCG TCG AGT GAA GAC GAC GAT GAT GAT GAC GAA AAA AAT GAG TAC	350
Ser Ser. Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu Lys Asn Glu Tyr	69
CTT CAA ATG ATT AAA AAA GGG AAT TCA GAG TTA GAG CCA TCT GTT	395
Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu Glu Pro Ser Val	84
CAT GAC ACT AGG GAC GAA GGT ACC GCT GAT AAT TGG ATT GAA CGC	440
His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp Ile Glu Arg	99
AAC TTT TCC ATG ATT CGT CTC ACC GGA AAG CAT CCA TTT AAC TCC	485
Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe Asn Ser	114
GAA CCA CCG TTG AAC CGG CTC ATG CAC CAC GGC TTT ATC ACA CCG	530
Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr Pro	129
GTC CCA CTT CAT TAC GTT CGT AAC CAT GGA CCG GTT CCC AAG GGC	575
Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly	144
ACG TGG GAT GAC TGG ACC GTG GAA GTC ACG GGA CTA GTG AAG CGT	620
Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg	159
CCT ATG AAA TTC ACA ATG GAC CAG TTG GTT AAC GAA TTC CCT TGT	665
Pro Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys	174
AGA GAA TTG CCC GTT ACG CTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA AGG AAA	710
Arg Glu Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys	189
GAA CAG AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GGC GCC	755
Glu Gln Asn Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala	204
GCT GCC GTT TCA ACA ACG ATA TGG CGC GGG GTA CCC CTC CGC GCT	800
Ala Ala Val Ser Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala	219

FIG.3...

3/5

TTG CTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG CTT	845
Leu Leu Lys Arg Cys Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu	234
AAT GTT TGC TTC GAA GGA GCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT GGT GGT	890
Asn Val Cys Phe Glu Gly Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Gly	249
TCA AAG TAT GGA ACC AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA ATG GAT CCA	935
Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro	264
GCA CGA GAT ATC ATC GTA GCC TAC ATG CAG AAC GGA GAA AAA TTG	980
Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu	279
GCA CCC GAC CAC GGG TTT CCA GTA CGA ATG ATA ATT CCA GGA TTC	1025
Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg Met Ile Ile Pro Gly Phe	294
ATT CGA GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA AAG AGG ATT ATA GTC ACC	1070
Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys Arg Ile Ile Val Thr	309
ACC CAA GAA TCA GAC AGC TAT TAT CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT	1115
Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys Asp Asn Arg Val	324
CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT GAA CTT GCA AAT ACC GAA GCA TGG	1160
Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr Glu Ala Trp	339
TGG TAC AAG CCA GAG TAT ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT	1205
Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile Asn Ser	354
GTC ATT ACG ACG CCG TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC	1250
Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn Ala	369
TGG ACG ACT CAG CGA CCT TAC ACG TTG AGG GGC TAT TCT TAT TCT	1295
Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser	384
GGC GGA GGG AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA	1340
Gly Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly	399
GGA GAA ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC	1385
Gly Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro	414
ACC AAA TAT GGC AAG TAC TGG TGT TGG TGC TTT TGG TCA CTC GAG	1430
Thr Lys Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu	429
GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT CGA	1475
Val Glu Val Leu Asp Leu Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg	444
GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT ATT TGG	1520
Ala Trp Asp Glu Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp	459
AAC GTC ATG GGA ATG ATG AAT AAT TGC TGG TTC CGA GTA AAG ATG	1565
Asn Val Met Gly Met Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met	474
AAT GTG TGC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA ATA GTG TTT GAG	1610

FIG. 3...

4/5

Asn Val Cys Lys Pro His Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu	489
CAT CCG ACT CAA CCT GGA AAC CAA TCA GGT GGA TGG ATG GCG AAG	1655
His Pro Thr Gln Pro Gly Asn Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys	504
GAG AGA CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG GCA CCT CAA ACA CTA AAG	1700
Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys	519
AAG AGT ATC TCA ACT CCA TTC ATG AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC	1745
Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met Asn Thr Ala Ser Lys Met Tyr	534
TCC ATG TCC GAG GTC AGG AAA CAC AGC TCT GCT GAC TCT GCT TGG	1790
Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser Ala Asp Ser Ala Trp	549
ATC ATA GTC CAT GGT CAT ATC TAT GAC GCC ACG CGT TTC TTG AAA	1835
Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr Arg Phe Leu Lys	564
GAT CAC CCT GGT GGG ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GGC ACT	1880
Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn Ala Gly Thr	579
GAT TGC ACT GAG GAA TTT GAT GCA ATT CAT TCT GAT AAG GCT AAG	1925
Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys Ala Lys	594
AAG CTC TTG GAG GAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT	1970
Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr Gly	609
TAC ACC TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GGA TCT TCT TCC	2015
Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser	624
TTC AGC AGC TTT CTA GCA CCT ATT AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG	2060
Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln	639
AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA CTC	2105
Arg Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu	654
ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT CGA TTT	2150
Ile Asp Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe	669
GCA TTG CCC TCT GAG GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT GTT GGA AAA	2195
Ala Leu Pro Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys	684
CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC GAT AAG CTC TGC ATG CGC	2240
His Ile Phe Leu Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg	699
GCT TAC ACG CCT ACT AGC ACG ATC GAT GAG GTG GGG TAC TTC GAG	2285
Ala Tyr Thr Pro Thr Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu	714
TTG GTT GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA ATT CAC CCT AAA TTC CCC	2330
Leu Val Val Lys Ile Tyr Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro	729
AAT GGA GGG CAA ATG TCA CAG TAT CTT GAT TCT ATG CCG TTA GGG	2375
Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly	744

FIG. 3...

515

TCA TTT CTC GAC GTG AAA GGT CCA TTA GGT CAC ATT GAA TAC CAA	2420
Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pr Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln	759
GGA AAG GGA AAT TTC TTA GTT CAT GGC AAA CAG AAG TTT GCC AAG	2465
Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly Lys Gln Lys Phe Ala Lys	774
AAG TTG GCC ATG ATA GCA GGT GGA ACA GGA ATA ACT CCA GTG TAT	2510
Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr Pro Val Tyr	789
CAA GTC ATG CAG GCA ATT CTG AAA GAT CCA GAA GAT GAC ACA GAA	2555
Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu Asp Asp Thr Glu	804
ATG TAT GTG GTG TAT GCT AAC AGA ACA GAG GAT GAT ATT TTA CTT	2600
Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp Ile Leu Leu	919
AAG GAA GAG CTT GAT TCA TGG GCT GAG AAA ATT CCA GAG AGG GTT	2645
Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu Arg Val	834
AAA GTT TGG TAT GTG GTT CAG GAT TCT ATT AAA GAA GGA TGG AAG	2690
Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp Lys	849
TAC AGC ATT GGT TTT ATT ACA GAA GCC ATT TTG AGA GAA CAT ATC	2735
Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile	864
CCT GAG CCA TCT CAC ACA ACA CTG GCT TTG GCT TGT GGA CCA CCT	2780
Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro	879
CCT ATG ATT CAA TTT GCT GTT AAT CCA AAC TTG GAG AAG ATG GGC	2825
Pro Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly	894
TAT GAC ATT AAG GAT TCC TTA TTG GTG TTC TAATTTAAAAACAAAACAA	2875
Tyr Asp Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe	904
TATCTGCAGGAATAAAATTTTTTTTTTCCCCCTATCAGTTGTACATATTGTATTGGTTTA	2935
TCACCCCATGTACTACGTAGTGTGTTGTAGTTCTTACATTTTTATTTTTAGAAATTTTT	2995
TAAACCTTAGGATATAAAGGTTTCTCTTCCAACAAAGTGATTCTTTAGGGAAGAAATGT	3055
ACTGTACTGTACTAGTATGTCTAAGCCGAAAGTTGTAATGTTTACCATGACAAATTGTAT	3115
TCAATTCTCATGGAATAGTAACATTGTGTTTCATGTGTCTTCCTGTAAGCGATCTTCAAA	3175
ATATCAATGTATATATATAGTAATTGCAAACCATGTTCCTTTTCCCGATGTAGTTAACT	3235
ACTCTTTCTTTAGCTTCTAGTCTCTGGTGAATATTTTTTTTTCTATAACTCTTTAATTAA	3295
TACGGCCTTAAATAAGAGAAAAGTTTAAACCACGAATATCATTATGCAGACGTATAGGTA	3355
ATTAATCTACTTTTTGAAAAAAATCTATTTTCTTTATGTGGTCCTTCAAAATAATATTC	3415
TAGAACCTTTTGTATATTCCCTTTTAACTTCTATTTAGTTTT	3457

FIG. 3

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement d la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9202658  
FA 469886  
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 18, Janvier 1992, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 363 - 375 DORBE, M-F, ET AL. 'The tomato nia gene complements a Nicotina plumbaginifolia nitrate reductase deficient mutant and is properly regulated'	10,13	
A	* page 371, colonne de gauche, alinéa 1 *	1-9,11, 12	
X	THE PLANT JOURNAL vol. 1, no. 2, Septembre 1991, pages 267 - 274 NUSSAUME, L., ET AL. 'Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics' * page 268 - page 269 *	10,13	
D,X	EMBO JOURNAL vol. 10, no. 5, 1991, EYNHAM, OXFORD GB pages 1027 - 1035 VINCENTZ, M., ET AL. 'Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of Nicotiana plumbaginifolia plants' * le document en entier *	10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
A		1-9, 11-13	C12N A01H
A	EP-A-0 283 338 (INRA) 21 Septembre 1988 * page 2, ligne 19 - ligne 26 *	10,12	
A	WO-A-9 104 325 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 4 Avril 1991 * page 26, ligne 17 - ligne 27 *	10,11	
Date d'achèvement de la recherche 27 NOVEMBRE 1992		Examinateur MADDOX A.D.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

3

EPO F RM 1503 00.82 (P0413)

**INSTITUT NATIONAL**  
**de la**  
**PROPRIETE INDUSTRIELLE**

# RAPPORT DE RECHERCHE

**établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche**

FR 9202658  
FA 469886  
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 227 909 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 8 Juillet 1987 * page 6, ligne 37 - ligne 42 * ----	10, 11
A	EP-A-0 303 780 (HOECHST) 22 Février 1989 * le document en entier * ----	10, 11
A	DATABASE WPIL Section Ch, Week 8418, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C03, AN 84-107932 & DD-A-205 603 (GRAESER) * abrégé *  -----	11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 27 NOVEMBRE 1992		Examinateur MADDOX A.D.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons</p> <p>-----  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

